

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/54, 9/12, C12Q 1/68, 1/48, G01N 33/53, C12N 15/11</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/29455 (43) Date de publication internationale: 22 décembre 1994 (22.12.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00686 (22) Date de dépôt international: 10 juin 1994 (10.06.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/07089 11 juin 1993 (11.06.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JOUBERT, Dominique [FR/FR]; F-34380 Mas-de-Londres (FR). ALVARO, Véronique [FR/FR]; 1, route de Corneilles, F-95810 Grisy-les-Platres (FR). LEVY, Laurence [FR/FR]; 105, rue la Convention, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cédex 07 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>
<p>(54) Title: MUTANT POLYPEPTIDE OF PROTEIN KINASE C, NUCLEIC ACID SEQUENCES CODING FOR SAID POLYPEPTIDE AND USE THEREOF (54) Titre: POLYPEPTIDE MUTANT DE LA PROTEINE KINASE G, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR LEDIT POLYPEPTIDE ET LEURS UTILISATIONS (57) Abstract A mutant polypeptide of protein kinase C shows localised D 294 G mutation with respect to PKCα. Nucleic acid sequences coding for said polypeptide nucleotide probes and antisense oligonucleotides are also disclosed. Application in cancer diagnosis or therapy. (57) Abrégé L'invention a pour objet un polypeptide mutant de la protéine kinase C qui possède, par rapport à la PKCα, une mutation ponctuelle D 294 G. L'invention a également pour objet les séquences d'acides nucléiques qui codent pour ledit polypeptide, ainsi que des sondes nucléotidiques et des oligonucléotides antisens. Application: diagnostic ou traitement thérapeutique des cancers.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

POLYPEPTIDE MUTANT DE LA PROTEINE KINASE C, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR LEDIT POLYPEPTIDE ET LEURS UTILISATIONS

5 La présente invention a pour objet un nouveau polypeptide mutant de la protéine kinase C et les acides nucléiques codant pour ledit polypeptide. Elle a également pour objet les utilisations de ce polypeptide ou des acides nucléiques pour l'élaboration d'outils utiles pour le diagnostic des cancers et/ou pour la préparation de moyens
10 pharmacologiques utiles pour le traitement des cancers, en particulier des cancers de l'hypophyse, du colon, du foie, du sein, de la vessie et de la thyroïde.

 La protéine kinase C, dénommée ci-après la PKC, est une enzyme calcium et phospholipide-dépendante, qui joue un rôle
15 important dans le métabolisme des cellules. En effet, elle participe à de nombreux procédés de régulation cellulaire, notamment à la sécrétion hormonale et la prolifération cellulaire. Elle est directement activée par les esters de phorbol, promoteurs des tumeurs et est une enzyme clé dans la transduction des signaux médiés par des facteurs de croissance
20 ou des hormones.

 Cette enzyme ainsi que ses propriétés dans les cellules néoplasiques sont décrites notamment par ROTENBERG et al. dans l'ouvrage intitulé "Biochemical and Molecular Aspects of selected
cancers" Vol. 1, ch. 2; 1991, édité par Academic Press Inc.

25 Cette enzyme existe sous différentes isoformes, telles que notamment l'isoforme α .

 La séquence de l'isoforme α de la protéine kinase C humaine, dénommée ci-après la PKC α humaine, a été décrite par FINKENZELLER et al. dans Nucleic Acids Research Vol. 18, N° 8,
30 2183 (1990).

 Des études récentes ont montré que l'activité et l'expression de la PKC étaient plus élevées dans les tumeurs humaines de l'hypophyse que dans les hypophyses humaines normales et les hypophyses de rat. A cet effet, on peut se référer aux travaux de V. ALVARO et al. dans Int. J.
35 Cancer : 50, 724-730 (1992).

Aucune relation n'a été trouvée entre l'activité et l'expression d'un côté et le volume tumoral ainsi que les taux hormonaux dans le plasma de l'autre. Cependant, lorsque l'on considère le caractère invasif, une nette distinction peut être faite entre les tumeurs invasives d'une part et les tumeurs non-invasives d'autre part. Selon les tests rapportés dans l'article cité ci-dessus, on a noté une augmentation semblable de l'activité et de l'expression dans les tumeurs non invasives (x 3) alors que dans les tumeurs invasives, l'activité de la PKC était multipliée par 3 environ, tandis que l'expression était multipliée par environ un facteur 9.

On sait que l'activité de la PKC est également altérée dans plusieurs autres tumeurs humaines, telles que par exemple les tumeurs du colon et du sein. Cette activité est augmentée de façon significative dans les tissus du sein malin alors que dans le tissu tumoral du colon elle est réduite par comparaison aux éléments normaux équivalents. Ces observations contribuent à l'idée que la PKC est affectée dans les tumeurs humaines et qu'elle participe à la tumorigénèse.

Cependant, lorsque l'on considère l'expression de la PKC, peu d'investigations ont été faites à ce sujet et on n'a pas recherché si les isoformes PKC étaient impliquées dans les modifications observées de l'activité de la PKC. De plus, le manque de corrélation étroite entre l'augmentation de l'activité enzymatique et l'augmentation de l'expression de la PKC dans les tumeurs invasives hypophysaires humaines ainsi que la relation particulière entre la surexpression de la PKC et le caractère invasif dans les tumeurs de l'hypophyse humaine ont conduit à l'hypothèse qu'il existait une anomalie dans la structure de l'enzyme.

On a maintenant trouvé que la PKC α est surexprimée dans les tumeurs invasives de l'hypophyse humaine et que cette PKC α possède une mutation ponctuelle.

La présente invention a donc pour objet un nouveau polypeptide mutant de la protéine kinase C qui présente la séquence [SEQ ID N°2] de 672 acides aminés.

Cette séquence d'acides aminés diffère de la séquence connue de la PKC α par l'acide aminé en position 294 qui est une glycine au lieu d'un acide aspartique.

Le nouveau polypeptide selon l'invention est donc la PKC α présentant une mutation ponctuelle en position 294, dénommée ci-après mutation D 294 G. Il a un poids moléculaire d'environ 80 kdaltons.

- 5 La mutation D 294 G est située dans une région stratégique de l'enzyme, la région V₃. Les différentes régions de la PKC sont indiquées sur la figure 1 qui est une représentation schématique des domaines constants et variables de l'enzyme PKC, telle que décrite par Stabel et al. (Stabel, S, Parker, PJ, 1991, "Protein Kinase C".
10 Pharmacol. Ther. 51 : 71-95). Cette région V₃ contient les sites sensibles à la calpaïne, les sites de liaison des "récepteurs" intra-cellulaires de la PKC ainsi que le site potentiel de liaison du calcium. La mutation D 294 G est localisée dans ce site potentiel de liaison du calcium et peut affecter l'affinité de l'enzyme pour le calcium. Ce site
15 n'a pas une configuration main EF classique correspondant à un motif hélice-boucle-hélice. En fait, il n'existe pas de possibilité pour qu'une première hélice se forme. La seconde hélice, bien que probablement plus courte que celle habituellement décrite est théoriquement possible (compte-tenu de la structure secondaire prédite en utilisant la méthode
20 GOR ("Prediction of protein structures and the principles of protein conformation", edited by G. D. Fasman, Plenum Press New York. 1989:417-465)). La boucle calcium démarre à l'acide glutamique à la position 292 (position X dans la boucle) et se termine à l'acide aminé glutamine à la position 303 (position-Z dans la boucle). L'acide aminé
25 294, qui est habituellement l'acide aspartique ou l'asparagine, est changé ici par une mutation ponctuelle en la glycine apolaire. Ceci pourrait rendre compte des changements proposés pour l'affinité calcium et en conséquence pour la fonctionnalité de l'enzyme. Il est, en effet, connu que la liaison du calcium à l'enzyme est une condition nécessaire pour
30 le transfert de l'enzyme du compartiment intra-cellulaire vers la membrane plasmique. En fait, il semble que la PKC soit accumulée dans le cytosol du fait que sa quantité dans le cytosol est sans aucun doute plus importante que dans la membrane pour les tumeurs invasives. Les conséquences de l'accumulation cytosolique de l'enzyme
35 sont cependant difficiles à tester du fait que l'enzyme ne peut pas être activée in vitro par des activateurs usuels. Sa présence dans les cellules

tumorales suggère que la mutation de la PKC α affecte probablement les processus de régulation normalement contrôlés par la PKC. La relation entre la mutation ponctuelle de la PKC α et le phénotype invasif des tumeurs de l'hypophyse conduit aux commentaires ci-après. En fait, la

5 PKC est impliquée dans la régulation des protéinases sécrétées telles que la stromélysine et la collagénase, qui sont des enzymes participant à l'apparition des métastases tumorales et à l'angiogénèse. Elle est également impliquée dans la biosynthèse des inhibiteurs des métalloprotéinases par des fibroblastes humains en culture.

10 L'invention a également pour objet les variants de ce polypeptide résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, étant entendu que ledit variant appartient toujours à la famille protéine kinase C et présente la même mutation ponctuelle que le polypeptide ci-dessus.

15 La présente invention a également pour objet les séquences d'acides nucléiques, à savoir les séquences d'ADN génomiques, les séquences d'ARNm ou d'ADNc, qui codent pour le polypeptide selon l'invention ou l'un quelconque de ses variants définis ci-dessus et qui sont constituées par :

- 20 a) la séquence d'ADN [SEQ ID N°1] ;
b) les séquences d'ADN hybridant avec la séquence ci-dessus ou un fragment de celle-ci ;
c) les séquences d'ADN qui en raison de la dégénérescence du code génétique résultent des séquences a) et b) ci-dessus et code pour le
- 25 polypeptide tel que défini ci-dessus ;
d) les séquences d'ARNm et d'ADNc correspondantes.

Le polypeptide selon l'invention peut être obtenu par la technique du génie génétique qui comprend les étapes de :

- 30 - culture d'un microorganisme transformé ou de cellules eucaryotes transfectées à l'aide d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et
- récupération du polypeptide produit par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes.

Cette technique est bien connue de l'homme de métier. Pour plus

35 de détail la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après :

Recombinant DNA technology I, Editors Ales Prokop, Rakesh K. Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, volume 646, 1991.

5 Les séquences d'ADN selon l'invention peuvent être obtenues à partir d'un ARN messager provenant d'une tumeur invasive selon les techniques classiques décrites par Maniatis et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Par exemple, les séquences d'ADN selon l'invention, peuvent être obtenues par le procédé qui consiste :

- 10 – à préparer les ARN totaux à partir d'une tumeur invasive ;
- à synthétiser un double brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de la préparation d'ARN avec une amorce oligodT ;
- à amplifier cet ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec des oligonucléotides spécifiques ;
- 15 – à cloner ce produit amplifié dans un plasmide ou un vecteur d'expression ;
- à l'amplifier par transformation bactérienne.

Pour chacune de ces étapes on utilise avantageusement les techniques classiques bien connues de l'homme de métier et décrites en
20 détail par MANIATIS et al. dans l'ouvrage cité ci-dessus.

L'invention a également pour objet les sondes nucléotidiques qui, par hybridation, permettent de détecter dans une tumeur, une séquence d'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention, une séquence d'ADN complémentaire ou une séquence d'ARN correspondante.

25 Les sondes nucléotidiques de l'invention sont spécifiques de la région caractéristique de la séquence d'ADN, d'ADNc ou d'ARN, à savoir de la partie portant la mutation ponctuelle du polypeptide selon l'invention.

Les sondes nucléotidiques selon l'invention sont des
30 oligonucléotides pouvant avoir une longueur variable qui est de préférence au minimum d'environ 5 à 15 nucléotides et au maximum d'environ 50 à 60 nucléotides.

Ces oligonucléotides sont préparés selon les techniques bien connues de l'homme de métier, telles que celles décrites par Maillet-
35 Baron et al. (Maillet-Baron L., Soussi T., Séquençage des acides nucléiques. Ed Tech Doc. Collection Génie Génétique, Chap. 6, 1993).

La spécificité de ces oligonucléotides permettant leur utilisation comme sondes peut être déterminée par la technique décrite par Randall K.SAIKI et al. dans NATURE, vol. 324, p.163-166, 1986, qui est basée sur la reconnaissance spécifique d'un allèle donné par une sonde
5 oligonucléotidique.

Dans le cas présent, on pourra utiliser comme allèle le fragment D (fragment 755-983 de la PKC α mutée - voir figure 1). Les oligonucléotides préparés ci-dessus seront appropriés comme sondes aux fins de l'invention s'ils s'hybrident avec le fragment D ci-dessus et
10 ne s'hybrident pas avec le fragment correspondant de la PKC α normale.

A titre d'exemple de sonde appropriée aux fins de l'invention, on peut citer la sonde ayant la séquence [SEQ ID N°3] :

ATT CCG GAA GGG GGC GAG GAA GGA AAC

A des fins de diagnostic, ces sondes sont soit marquées par un isotope radioactif soit chimiquement modifiées par un agent fluorescent
15 ou un résidu, tel que la digoxigénine, reconnu par un anticorps ou une enzyme. Ces sondes ainsi marquées permettent selon les méthodes classiques d'identifier s'il y a hybridation ou non avec une séquence d'ADN, une séquence d'ADNc ou une séquence d'ARNm.

20 Les sondes nucléotidiques selon l'invention conviennent également comme oligonucléotides antisens pour le blocage de la transcription ou de la traduction de l'ARNm de la PKC α portant la mutation D 294 G soit in vitro, soit in vivo.

Ces oligonucléotides antisens sont des inhibiteurs de la transcription ou de la traduction de la PKC α mutée qui peuvent être
25 utilisés en thérapie pour le traitement des cancers à tumeur invasive ou des tumeurs exprimant la PKC α mutée, éventuellement en combinaison avec une toxine , telle que la ricine ou tout autre élément permettant de détruire les cellules cancéreuses.

30 La présente invention a également pour objet un procédé de diagnostic des tumeurs, telles que par exemple des tumeurs du foie, du sein, du colon, de la vessie, de la thyroïde, qui consiste à détecter soit le polypeptide selon l'invention, soit une séquence d'ADN ou une séquence d'ARN codant pour ledit polypeptide dans un échantillon
35 biologique de la tumeur.

La détection de la séquence d'ADN codant pour ledit polypeptide peut être réalisée par la technique d'hybridation à l'aide d'une sonde nucléotidique telle que définie ci-dessus.

Ce procédé de diagnostic comprend les étapes :

- 5 a) d'amplification préalable des séquences d'ADN génomiques ou d'ADNc fabriquées à partir d'ARNm contenues dans un échantillon biologique d'un patient, au moyen d'amorces, telles des amorces d'ADN,
- b) mise en contact de l'échantillon biologique avec une sonde
10 nucléotidique selon l'invention ;
- c) détection du complexe d'hybridation qui s'est éventuellement formé.

La détection de la séquence d'ARN codant pour ledit polypeptide peut être réalisée par la technique d'hybridation in situ à l'aide d'une sonde nucléotidique telle que définie ci-dessus et détection du
15 complexe d'hybridation qui s'est éventuellement formé.

La détection du polypeptide selon l'invention peut être réalisée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement la PKC α mutée.

L'invention a également pour objet les anticorps dirigés contre le
20 polypeptide selon l'invention, qui conviennent notamment pour la détection du polypeptide selon l'invention.

Ces anticorps peuvent être des anticorps polyclonaux obtenus selon les procédés classiques d'immunisation d'animaux.

Ces anticorps peuvent également être des anticorps monoclonaux
25 obtenus selon le procédé bien connu des KOHLER G. et MILSTEIN C., Nature (1975) vol. 256, p. 495-497.

L'invention a également pour objet les vecteurs recombinants pour le clonage et/ou l'expression qui contiennent une séquence d'ADN selon l'invention. Ces vecteurs, qui peuvent être des plasmides, des
30 cosmides, des phages ou des virus, contiennent en plus de la séquence d'ADN selon l'invention, les moyens appropriés pour leur replication et/ou leur expression, tels que promoteurs forts de virus, promoteurs activables par des facteurs variés, origine de réplication, etc...

Les vecteurs recombinants peuvent être utilisés pour transfecter
35 des modèles cellulaires à des fins d'études in vitro et pour la sélection de médicaments ou autres agents anti-tumoraux.

Ainsi la présente invention a également pour objet les cellules hôtes transfectées avec la séquence d'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention à l'aide des vecteurs ci-dessus. Ces cellules peuvent être par exemple des cellules GC ou des cellules hypophysaires hyperplasiées.

Un premier modèle cellulaire approprié peut être obtenu à partir d'une lignée de cellules hypophysaires tumorales n'exprimant pas le phénotype invasif, les cellules GC. Ces cellules sécrètent de l'hormone de croissance et forment des tumeurs *in vivo* lorsqu'elles sont implantées sous la peau du dos. *In vivo*, ces tumeurs ne donnent pas de métastases. En plus, elles n'expriment pas la forme mutée de la PKC α .

Les cellules GC ainsi transfectées pourront être soit cultivées *in vitro*, soit implantées *in vivo*.

Sur les cellules GC cultivées *in vitro* on peut mesurer :

- l'expression de la PKC α mutée,
- l'hormone de croissance (GH),
- le taux de prolifération cellulaire par incorporation de thyroïdine ^3H ,
- l'activité et l'expression de la PKC α ,
- la morphologie des cellules,
- la sécrétion de la cathépsine D, enzyme protéolytique participant à la destruction de la membrane basale.

Sur les cellules implantées *in vivo* on peut mesurer :

- l'invasion locale des tissus,
- l'apparition de métastases,
- l'hormone de croissance (GH),
- l'expression et l'activité de la PKC α dans les tumeurs.

Un deuxième modèle expérimental consiste à transfecter la PKC α mutée dans des cellules hypophysaires hyperplasiées, obtenue chez le rat estrogénisé.

Dans ce cas, la transfection est transitoire et les mêmes paramètres que ceux mesurés *in vitro* pour les cellules GC peuvent aussi être estimés.

Ces modèles expérimentaux conviennent particulièrement bien pour la sélection de médicaments ou agents anti-tumoraux appropriés.

Le polypeptide selon l'invention peut également être utilisé en biochimie et en enzymologie pour étudier les conséquences de la mutation sur les fonctions de l'enzyme, pour tester des molécules visant à reconnaître spécifiquement le polypeptide selon l'invention, pour
5 étudier les interactions spécifiques du polypeptide selon l'invention avec tout élément cellulaire.

L'invention va être maintenant illustrée plus en détail par les exemples non limitatifs ci-après.

Dans ces exemples, on a utilisé des tumeurs de l'hypophyse (sécrétant l'hormone de croissance (GH), sécrétant la prolactine (PRL) ou sécrétant l'hormone adénocorticotrope (ACTH) et des tumeurs non-sécrétantes) qui ont été obtenues dans des salles d'opération après des adénomectomies transphénoïdales. Des fragments des tumeurs ont été congelés dans de l'azote liquide. D'autres fragments ont été utilisés pour
10 des tests de microscopie et des tests immunocytochimiques. Le diagnostic avant l'opération a été établi par des critères cliniques, biologiques et radiologiques. Les études morphologiques et immunocytochimiques ont confirmé le diagnostic. Le caractère invasif a été établi par le neurochirurgien au cours de l'opération et correspond
15 à l'invasion de la "dura mata" ou du diaphragme sellaire.
20

FIGURES :

FIG. 1 : Représentation schématique des domaines variables et constants de la PKC ainsi que des fragments A, B, C et D obtenus par PCR.
25

FIG. 2 : Autoradiographie d'un immunoblot de la PKC α : a et d, hypophyse normale ; b et e, tumeur non invasive ; c et f, tumeur invasive ; a, b, c, fraction cytosolique ; d, e, f, fraction membranaire.
30

FIG. 3. : Comparaison de l'activité et de l'expression de la PCK dans les tumeurs invasives et non invasives.
35

FIGS. 4 et 5 : Analyse de la séquence nucléotidique dans la région amplifiée par PCR entourant le codon 294 obtenue par séquençage selon la technique de Sanger.

5

Exemple 1 : mesure de l'activité et de l'expression de la PKC α dans des tumeurs invasives et des tumeurs non invasives de l'hypophyse humaine

L'activité protéine kinase C a été déterminée selon la méthode de BIRMAN et al. décrite dans Acta endocrino., 121, 489-494 (1989).

Cette méthode consiste à préparer les fractions soluble et membranaire des homogénats tissulaires et à obtenir par filtration sur colonne échangeuse d'ions, une préparation semi-purifiée de la PKC. L'activité de l'enzyme est mesurée par incorporation de P³² dans un substrat exogène (histone IIIS) en présence et en absence de calcium, phospholipides et diacylglycérol.

Comme indiqué sur la figure 2, l'expression de la PKC α est augmentée dans les fractions solubles et membranaires des tumeurs d'hypophyse testées par comparaison avec les fractions provenant d'hypophyses de rat normales et ceci quelque soit la nature de la tumeur (sécrétante ou non).

L'expression de la PKC α est déterminée selon la méthode décrite par V. ALVARO et al. dans Int. J. Cancer : 50, 724-730 (1992).

Les résultats sont reportés sur la figure 3 sur laquelle on a utilisé les légendes ci-après :

■ : activité PKC
▨ : expression PKC

30

Cette figure montre que l'activité et l'expression de la PKC dans les tumeurs non invasives sont augmentées de la même façon alors que dans les tumeurs invasives l'augmentation de l'expression de la PKC est nettement supérieure à celle de l'activité de la PKC.

35

Exemple 2 : analyse "Western Blot (immunoblot)"

Dans cet exemple, le matériel ci-après a été utilisé :

- 5 – membrane "Immobilon" fournie par la Société Millipore.
- anti-sérum polyclonal dirigé contre la protéine PKC α , donné généreusement par le Docteur SAITOH, Département de neurochimie, Université de Californie, San Diego, La Jolla, USA.
- le second anticorps marqué à l'iode 125 (anti IgG de lapin) a
- 10 été fourni par Amersham [Réf. IM 134].

Séquençage :

Le RNazole [RNA 15.01–100] et les oligonucléotides ont été obtenus auprès de la Société Bioprobe.

15 La reverse transcriptase AMV (superscript preamplification système) a été fournie par Bethesda Research Laboratories USA.

La polymérase DNA Taq a été fourni par Boehringer. Le kit de clonage TA cloning version 1.3 fourni par Invitrogen et le kit de Séquençage par la séquenase 2.0 fourni par USB.

20 Des tumeurs d'hypophyse humaine et des hypophyses de rat normales (200 mg) ont été homogénéisées (1/5 : poids/volume) dans 10 mmol/l de tampon Tris HCL contenant 2 mmol/l d'EDTA et 0,1 mmol/l de phénylméthylsulfonylfluorure pH 7,4 (tampon A). Après centrifugation à 800 x g pendant 4 minutes, le surnageant a été centrifugé pendant 45 minutes à 37000 x g fournissant le cystosol

25 (fraction soluble) et le culot membranaire. Ce dernier a été remis en suspension dans 1 ml de tampon A contenant 1 % de Nonidet P40 [Sigma] et recentrifugé ultérieurement pendant 15 minutes à 37000 x g. Le surnageant résultant constitue la fraction membranaire.

30 Les fractions solubles et les fractions membranaires ont été portées à ébullition pendant 10 minutes dans le tampon SDS PAGE (25 mM, Tris-HCl pH 8,8, 10 % de dodécyl sulfate de sodium, 10 % de glycérol, 10 % de β mercaptoéthanol et 0,05 % de bleu de bromophenol, concentrations finales). Des quantités égales de protéines de chaque échantillon (100 μ g) ont été déposées sur des gels selon la

35 méthode de Laemmli [NATURE 227, 680–685 (1970)] en utilisant un gel de séparation contenant 10 % d'acrylamide, transférées sur la

membrane immobilon. Cette membrane est incubée avec l'antisérum polyclonal dirigé contre la protéine PKC α (dilution finale 1/2000è).

Les immunoblots ont été marqués avec le second anticorps, lui-même marqué à l'iode 125 (anti IgG de lapin) et mis en contact avec un
5 film Kodak à - 80°C. Les concentrations de protéine ont été déterminées par la méthode de Lowry [J. Biol. Chem. 193, 265-271 (1951)].

Exemple 3 : séquençage

10

Pour effectuer le séquençage de l'ADNc amplifié par PCR et sous-clôné, on a extrait l'ARN total de chaque homogénat de tumeurs avec le RNazole, selon une méthode dérivée de celle de Chomczynski et al. (Annal Biochem, 162, 156, 1987).

15

Un premier brin d'ADNc a été produit dans une réaction contenant 1 μ g d'ARN total, des amorces oligo (dT) et la reverse transcriptase en utilisant le kit de réserve transcriptase AMV selon les recommandations du fabricant. 50 % du volume réactionnel de l'ADNc a été amplifié selon la méthode décrite par SAIKI et al. dans SCIENCE
20 1988, 239, 487-491. La séquence totale de la protéine PKC α a été amplifiée en trois fragments de 1 kb chacun : A, B, C.

25

Le mélange PCR contenait 2,5 U ADN polymérase de *Thermus Aquaticus* (Taq) et 50 pmoles de chaque amorce. Les amorces suivantes ont été utilisées :

Pour le fragment A :

5'-GGAGCAAGAGGTGGTTGG-3' [SEQ ID N°4] (amorce 5' ; nucléotides 1 à 18) ;

5'-CTTCAGAGGGACTGATGACT-3' [SEQ ID N°5] (amorce 3' ;
30 nucléotides 975 à 994).

Pour le fragment B :

5'-GCCTCTGCGGAATGGATCAC-3' [SEQ ID N°6] (amorce 5' ; nucléotides 473 à 492) ;

5'-CTCCATCCATCATGTGTTCC-3' [SEQ ID N°7] (amorce 3' ;
35 nucléotides 1485 à 1504).

Pour le fragment C :

5'-GACCTCATGTACCACATTCA-3' [SEQ ID N°8] (amorce 5' ;
nucléotides 1297 à 1316) ;

5'-CTTCCACTAAGATAATGTTC-5' [SEQ ID N°9] (amorce 3' ;
5 nucléotides 2226 à 2245).

L'amplification a été réalisée en 30 cycles de 30 secondes à 94°C,
30 secondes à 55° C (amorce du fragment A), 60° C (amorce du
fragment B), 60° C (amorce du fragment C), 1 minute à 72° C dans le
Thermocycle Cetus Perkin-Elmer. L'ADN amplifié a été purifié sur du
10 gel d'agarose puis cryoélué et précipité à l'éthanol. L'ADN purifié a été
directement sous-clôné dans un vecteur PCRTM II selon la protocole
du kit de clonage TA cloning fourni par Invitrogen. La méthode de
séquençage à la séquenase a été utilisée pour déterminer la séquence
codante entière de la protéine PKC α à partir d'au moins 7 sous-clones
15 pour chaque fragment PCR (A, B, C) provenant de deux tumeurs
différentes (N° 1 et N° 2 du tableau I) et deux PCR différents pour
chaque tumeur de manière à différencier les mutations des erreurs Taq.
Le séquençage a été réalisé sur les deux brins avec les amorces utilisées
dans la réaction d'amplification.

20 Pour l'examen des autres tumeurs et les tissus contrôles (2
hypophyses humaines normales et un colon normal) le premier brin
d'ADNc, l'ADNc amplifié par la méthode PCR et le sous-clonage ont
été réalisés comme décrit ci-dessus en utilisant les deux amorces
choisies autour du point de mutation trouvé dans les deux premières
25 tumeurs délimitant ainsi un quatrième fragment le fragment D :

5'-GACCGACGACTGTCTGTAGA-3' [SEQ ID N°10] (amorce 5' ;
nucléotides 726 à 745) et

5'-CAGGGAGACTTCTGTCCTT-3' [SEQ ID N°11] (amorce 3' ;
nucléotides 983 à 1001).

30 L'amplification a été réalisée au cours de 30 cycles de
30 secondes à 94° C, 30 secondes à 55° C, 1 minute à 72° C dans un
Thermocycle Perkin Elmer Cetus. Pour chaque fragment PCR, 7 sous-
clones ont été séquencés.

35 RESULTATS

Expression de la protéine PKC α

Ainsi que cela est montré dans la figure 3, l'expression de la PKC α est augmentée dans les fractions membranaires et dans les fractions solubles de toutes les tumeurs d'hypophyse testées (n=5) par comparaison aux hypophyses de rats et ceci quelque soit la nature de la tumeur sécrétante ou non.

Analyse de la séquence

Le séquençage complet de l'ADNc de la protéine PKC α extraite de 8 tumeurs d'hypophyse humaine a révélé la présence d'une mutation ponctuelle à la position 908 de l'ADNc (région V₃ de la protéine, voir figure 1) des tumeurs invasives conduisant ainsi à un changement d'acide aminé. L'acide aspartique chargé négativement (position 294) a été changé en une glycine apolaire, le codon GAC devenant alors le codon GGC (voir figures 4 et 5 et tableau 1). Au contraire, aucune mutation ponctuelle n'a été détectée dans les ADNc des tumeurs non-invasives.

La proportion des sous-clones dérivés de l'ADNc de tumeurs invasives et présentant la mutation variait d'une tumeur à l'autre : 5 sur 7 pour l'adénome 1 ; 2 sur 7 pour l'adénome 2 ; 3 sur 7 pour l'adénome 3 ; et 1 sur 7 pour l'adénome 4. Le mutant de la PKC α est ainsi moins représenté que la PKC α normale.

Tableau 1 : mutation de la PKC α dans les tumeurs de l'hypophyse

Tumeur	Immunocytochimie	Codon 294
Groupe 1 : invasive		
1	GH	Gly
2	GH/PRL	Gly
3	NIR	Gly
4	ACTH	Gly
Groupe 2 : non invasive		
5	NIR	Asp
6	NIR	Asp
7	GH	Asp
8	PRL	Asp

* NIR : cellules non immunoréactives
GH hormone de croissance ; PRL Prolactine ;
ACTH Hormone Adrénocorticotrope ;

5 **EXEMPLE 4 : détection de la mutation de la PKC α dans des tumeurs de la thyroïde humaine**

15 prélèvements de thyroïdes adénomateuses ou tumorales ont été examinés.

- 10 La répartition histologique de ces prélèvements est la suivante :
- thyroïde adénomateuse (hyperplasie multinodulaire) sans signes apparents de malignité (n=9) ;
 - thyroïde hyperplasiée normale provenant de la zone adjacente au nodule bénin ou malin (n=2) ;
 - 15 – tumeur maligne (n=4).

Les résultats du séquençage ont montré que :

- 1) le polypeptide mutant de la PKC α [SEQ ID N°2] n'est pas particulier à la tumeur de l'hypophyse dans laquelle il a été découvert à l'origine.
- 20 2) il a été retrouvé dans 4 prélèvements d'hyperplasie multinodulaire sur les 6 déjà analysés. Il est à noter ici que l'hyperplasie multinodulaire constitue pour la tumeur de la thyroïde le stade préalable à la tumeur.
- 3) le polypeptide mutant de la PKC α n'a pas été trouvé dans le
- 25 tissu hyperplasié normal.
- 4) le mutant a déjà été trouvé dans une tumeur des tumeurs analysées, ce résultat est en cours de confirmation.

La présence du polypeptide mutant de la PKC α dans un nodule caractérisé par l'anatomopathologiste comme hyperplasie bénigne est un

30 signe de malignité et montre l'intérêt de l'utilisation de marqueurs moléculaires fiables indicateurs d'un stade précoce de tumorigénèse.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS CEDEX 13
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75654
- (G) TELEPHONE: 44 23 60 00
- (H) TELECOPIE: 45 85 68 56

(ii) TITRE DE L' INVENTION: POLYPEPTIDE MUTANT DE LA PROTEINE KINASE C,
SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR LEDIT
POLYPEPTIDE ET LEURS UTILISATIONS

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE DEPOT: FR 93 07089
- (B) DATE DE DEPOT: 11-JUN-1993

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2245 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(iii) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLEMENT: 28..2043

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGAGCAAGAG GTGGTTGGGG GGGGACC ATG GCT GAC GTT TTC CCG GGC AAC	51
Met Ala Asp Val Phe Pro Gly Asn	
1 5	
GAC TCC ACG GCG TCT CAG GAC GTG GCC AAC CGC TTC GCC CGC AAA GGG	99
Asp Ser Thr Ala Ser Gln Asp Val Ala Asn Arg Phe Ala Arg Lys Gly	
10 15 20	
GCG CTG AGG CAG AAG AAC GTG CAC GAG GTG AAG GAC CAC AAA TTC ATC	147
Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His Glu Val Lys Asp His Lys Phe Ile	
25 30 35 40	
GCG CGC TTC TTC AAG CAG CCC ACC TTC TGC AGC CAC TGC ACC GAC TTC	195
Ala Arg Phe Phe Lys Gln Pro Thr Phe Cys Ser His Cys Thr Asp Phe	
45 50 55	
ATC TGG GGG TTT GGG AAA CAA GGC TTC CAG TGC CAA GTT TGC TGT TTT	243
Ile Trp Gly Phe Gly Lys Gln Gly Phe Gln Cys Gln Val Cys Cys Phe	
60 65 70	
GTG GTC CAC AAG AGG TGC CAT GAA TTT GTT ACT TTT TCT TGT CCG GGT	291
Val Val His Lys Arg Cys His Glu Phe Val Thr Phe Ser Cys Pro Gly	
75 80 85	
GCG GAT AAG GGA CCC GAC ACT GAT GAC CCC AGG AGC AAG CAC AAG TTC	339
Ala Asp Lys Gly Pro Asp Thr Asp Asp Pro Arg Ser Lys His Lys Phe	
90 95 100	
AAA ATC CAC ACT TAC GGA AGC CCC ACC TTC TGC GAT CAC TGT GGG TCA	387
Lys Ile His Thr Tyr Gly Ser Pro Thr Phe Cys Asp His Cys Gly Ser	
105 110 115 120	
CTG CTC TAT GGA CTT ATC CAT CAA GGG ATG AAA TGT GAC ACC TGC GAT	435
Leu Leu Tyr Gly Leu Ile His Gln Gly Met Lys Cys Asp Thr Cys Asp	
125 130 135	
ATG AAC GTT CAC AAG CAA TGC GTC ATC AAT GTC CCC AGC CTC TGC GGA	483
Met Asn Val His Lys Gln Cys Val Ile Asn Val Pro Ser Leu Cys Gly	
140 145 150	

ATG GAT CAC ACT GAG AAG AGG GGG CGG ATT TAC CTA AAG GCT GAG GTT	531
Met Asp His Thr Glu Lys Arg Gly Arg Ile Tyr Leu Lys Ala Glu Val	
155 160 165	
GCT GAT GAA AAG CTC CAT GTC ACA GTA CGA GAT GCA AAA AAT CTA ATC	579
Ala Asp Glu Lys Leu His Val Thr Val Arg Asp Ala Lys Asn Leu Ile	
170 175 180	
CCT ATG GAT CCA AAC GGG CTT TCA GAT CCT TAT GTG AAG CTG AAA CTT	627
Pro Met Asp Pro Asn Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Leu Lys Leu	
185 190 195 200	
ATT CCT GAT CCC AAG AAT GAA AGC AAG CAA AAA ACC AAA ACC ATC CGC	675
Ile Pro Asp Pro Lys Asn Glu Ser Lys Gln Lys Thr Lys Thr Ile Arg	
205 210 215	
TCC ACA CTA AAT CCG CAG TGG AAT GAG TCC TTT ACA TTC AAA TTG AAA	723
Ser Thr Leu Asn Pro Gln Trp Asn Glu Ser Phe Thr Phe Lys Leu Lys	
220 225 230	
CCT TCA GAC AAA GAC CGA CGA CTG TCT GTA GAA ATC TGG GAC TGG GAT	771
Pro Ser Asp Lys Asp Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile Trp Asp Trp Asp	
235 240 245	
CGA ACA ACA AGG AAT GAC TTC ATG GGA TCC CTT TCC TTT GGA GTT TCG	819
Arg Thr Thr Arg Asn Asp Phe Met Gly Ser Leu Ser Phe Gly Val Ser	
250 255 260	
GAG CTG ATG AAG ATG CCG GCC AGT GGA TGG TAC AAG TTG CTT AAC CAA	867
Glu Leu Met Lys Met Pro Ala Ser Gly Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Gln	
265 270 275 280	
GAA GAA GGT GAG TAC TAC AAC GTA CCC ATT CCG GAA GGG GGC GAG GAA	915
Glu Glu Gly Glu Tyr Tyr Asn Val Pro Ile Pro Glu Gly Gly Glu Glu	
285 290 295	
GGA AAC ATG GAA CTC AGG CAG AAA TTC GAG AAA GCC AAA CTT GGC CCT	963
Gly Asn Met Glu Leu Arg Gln Lys Phe Glu Lys Ala Lys Leu Gly Pro	
300 305 310	
GCT GGC AAC AAA GTC ATC AGT CCC TCT GAA GAC AGG AAA CAA CCT TCC	1011
Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro Ser Glu Asp Arg Lys Gln Pro Ser	
315 320 325	

AAC AAC CTT GAC CGA GTG AAA CTC ACG GAC TTC AAT TTC CTC ATG GTG Asn Asn Leu Asp Arg Val Lys Leu Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val 330 335 340	1059
TTG GGA AAG GGG AGT TTT GGA AAG GTG ATG CTT GCC GAC AGG AAG GGC Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Met Leu Ala Asp Arg Lys Gly 345 350 355 360	1107
ACA GAA GAA CTG TAT GCA ATC AAA ATC CTG AAG AAG GAT GTG GTG ATT Thr Glu Glu Leu Tyr Ala Ile Lys Ile Leu Lys Lys Asp Val Val Ile 365 370 375	1155
CAG GAT GAT GAC GTG GAG TGC ACC ATG GTA GAA AAG CGA GTC TTG GCC Gln Asp Asp Asp Val Glu Cys Thr Met Val Glu Lys Arg Val Leu Ala 380 385 390	1203
CTG CTT GAC AAA CCC CCG TTC TTG ACG CAG CTG CAC TCC TGC TTC CAG Leu Leu Asp Lys Pro Pro Phe Leu Thr Gln Leu His Ser Cys Phe Gln 395 400 405	1251
ACA GTG GAT CGG CTG TAC TTC GTC ATG GAA TAT GTC AAC GGT GGG GAC Thr Val Asp Arg Leu Tyr Phe Val Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Asp 410 415 420	1299
CTC ATG TAC CAC ATT CAG CAA GTA GGA AAA TTT AAG GAA CCA CAA GCA Leu Met Tyr His Ile Gln Gln Val Gly Lys Phe Lys Glu Pro Gln Ala 425 430 435 440	1347
GTA TTC TAT GCG GCA GAG ATT TCC ATC GGA TTG TTC TTT CTT CAT AAA Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ser Ile Gly Leu Phe Phe Leu His Lys 445 450 455	1395
AGA GGA ATC ATT TAT AGG GAT CTG AAG TTA GAT AAC GTC ATG TTG GAT Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp Asn Val Met Leu Asp 460 465 470	1443
TCA GAA GGA CAT ATC AAA ATT GCT GAC TTT GGG ATG TGC AAG GAA CAC Ser Glu Gly His Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His 475 480 485	1491
ATG ATG GAT GGA GTC ACG ACC AGG ACC TTC TGT GGG ACT CCA GAT TAT Met Met Asp Gly Val Thr Thr Arg Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr 490 495 500	1539

ATC GCC CCA GAG ATA ATC GCT TAT CAG CCG TAT GGA AAA TCT GTG GAC Ile Ala Pro Glu Ile Ile Ala Tyr Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp 505 510 515 520	1587
TGG TGG GCC TAT GGC GTC CTG TTG TAT GAA ATG CTT GCC GGG CAG CCT Trp Trp Ala Tyr Gly Val Leu Leu Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Pro 525 530 535	1635
CCA TTT GAT GGT GAA GAT GAA GAC GAG CTA TTT CAG TCT ATC ATG GAG Pro Phe Asp Gly Glu Asp Glu Asp Glu Leu Phe Gln Ser Ile Met Glu 540 545 550	1683
CAC AAC GTT TCC TAT CCA AAA TCC TTG TCC AAG GAG GCT GTT TCT ATC His Asn Val Ser Tyr Pro Lys Ser Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile 555 560 565	1731
TGC AAA GGA CTG ATG ACC AAA CAC CCA GCC AAG CGG CTG GGC TGT GGG Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly 570 575 580	1779
CCT GAG GGG GAG AGG GAC GTG AGA GAG CAT GCC TTC TTC CGG AGG ATC Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val Arg Glu His Ala Phe Phe Arg Arg Ile 585 590 595 600	1827
GAC TGG GAA AAA CTG GAG AAC AGG GAG ATC CAG CCA CCA TTC AAG CCC Asp Trp Glu Lys Leu Glu Asn Arg Glu Ile Gln Pro Pro Phe Lys Pro 605 610 615	1875
AAA GTG TGT GGC AAA GGA GCA GAG AAC TTT GAC AAG TTC TTC ACA CGA Lys Val Cys Gly Lys Gly Ala Glu Asn Phe Asp Lys Phe Phe Thr Arg 620 625 630	1923
GGA CAG CCC GTC TTA ACA CCA CCT GAT CAG CTG GTT ATT GCT AAC ATA Gly Gln Pro Val Leu Thr Pro Pro Asp Gln Leu Val Ile Ala Asn Ile 635 640 645	1971
GAC CAG TCT GAT TTT GAA GGG TTC TCG TAT GTC AAC CCC CAG TTT GTG Asp Gln Ser Asp Phe Glu Gly Phe Ser Tyr Val Asn Pro Gln Phe Val 650 655 660	2019
CAC CCC ATC TTA CAG AGT GCA GTA TGAACTCAC CAGCGAGAAC AAACACCTCC His Pro Ile Leu Gln Ser Ala Val 665 670	2073
CCAGCCCCCA GCCCTCCCCG CAGTGGAAGT GAATCCTTAA CCCTAAAATT TTAAGGCCAC	2133

GGCTTGTGTC TGATTCCATA TGGAGGCCTG AAAATTGTAG GGTATTAGT CCAAATGTGA 2193

TCAACTGTC AGGGTCTTTC TCTACAACC AAGAACATTA TCTTAGTGGA AG 2245

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 672 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met	Ala	Asp	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Ser	Thr	Ala	Ser	Gln	Asp	Val
1				5				10						15	
Ala	Asn	Arg	Phe	Ala	Arg	Lys	Gly	Ala	Leu	Arg	Gln	Lys	Asn	Val	His
			20					25					30		
Glu	Val	Lys	Asp	His	Lys	Phe	Ile	Ala	Arg	Phe	Phe	Lys	Gln	Pro	Thr
		35					40					45			
Phe	Cys	Ser	His	Cys	Thr	Asp	Phe	Ile	Trp	Gly	Phe	Gly	Lys	Gln	Gly
	50					55					60				
Phe	Gln	Cys	Gln	Val	Cys	Cys	Phe	Val	Val	His	Lys	Arg	Cys	His	Glu
65					70					75					80
Phe	Val	Thr	Phe	Ser	Cys	Pro	Gly	Ala	Asp	Lys	Gly	Pro	Asp	Thr	Asp
				85					90					95	
Asp	Pro	Arg	Ser	Lys	His	Lys	Phe	Lys	Ile	His	Thr	Tyr	Gly	Ser	Pro
			100					105					110		
Thr	Phe	Cys	Asp	His	Cys	Gly	Ser	Leu	Leu	Tyr	Gly	Leu	Ile	His	Gln
		115					120					125			
Gly	Met	Lys	Cys	Asp	Thr	Cys	Asp	Met	Asn	Val	His	Lys	Gln	Cys	Val
	130					135					140				
Ile	Asn	Val	Pro	Ser	Leu	Cys	Gly	Met	Asp	His	Thr	Glu	Lys	Arg	Gly
145					150					155					160
Arg	Ile	Tyr	Leu	Lys	Ala	Glu	Val	Ala	Asp	Glu	Lys	Leu	His	Val	Thr
				165					170					175	
Val	Arg	Asp	Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Pro	Met	Asp	Pro	Asn	Gly	Leu	Ser
			180					185					190		
Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Pro	Asp	Pro	Lys	Asn	Glu	Ser
		195					200					205			
Lys	Gln	Lys	Thr	Lys	Thr	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Asn	Pro	Gln	Trp	Asn
	210					215					220				
Glu	Ser	Phe	Thr	Phe	Lys	Leu	Lys	Pro	Ser	Asp	Lys	Asp	Arg	Arg	Leu
225					230					235					240

Ser Val Glu Ile Trp Asp Trp Asp Arg Thr Thr Arg Asn Asp Phe Met
 245 250 255
 Gly Ser Leu Ser Phe Gly Val Ser Glu Leu Met Lys Met Pro Ala Ser
 260 265 270
 Gly Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Gln Glu Glu Gly Glu Tyr Tyr Asn Val
 275 280 285
 Pro Ile Pro Glu Gly Gly Glu Glu Gly Asn Met Glu Leu Arg Gln Lys
 290 295 300
 Phe Glu Lys Ala Lys Leu Gly Pro Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro
 305 310 315 320
 Ser Glu Asp Arg Lys Gln Pro Ser Asn Asn Leu Asp Arg Val Lys Leu
 325 330 335
 Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys
 340 345 350
 Val Met Leu Ala Asp Arg Lys Gly Thr Glu Glu Leu Tyr Ala Ile Lys
 355 360 365
 Ile Leu Lys Lys Asp Val Val Ile Gln Asp Asp Asp Val Glu Cys Thr
 370 375 380
 Met Val Glu Lys Arg Val Leu Ala Leu Leu Asp Lys Pro Pro Phe Leu
 385 390 395 400
 Thr Gln Leu His Ser Cys Phe Gln Thr Val Asp Arg Leu Tyr Phe Val
 405 410 415
 Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Asp Leu Met Tyr His Ile Gln Gln Val
 420 425 430
 Gly Lys Phe Lys Glu Pro Gln Ala Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ser
 435 440 445
 Ile Gly Leu Phe Phe Leu His Lys Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu
 450 455 460
 Lys Leu Asp Asn Val Met Leu Asp Ser Glu Gly His Ile Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His Met Met Asp Gly Val Thr Thr Arg
 485 490 495
 Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Ile Ala Tyr
 500 505 510
 Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Trp Trp Ala Tyr Gly Val Leu Leu
 515 520 525
 Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Pro Pro Phe Asp Gly Glu Asp Glu Asp
 530 535 540
 Glu Leu Phe Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ser Tyr Pro Lys Ser
 545 550 555 560
 Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His
 565 570 575
 Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val Arg
 580 585 590
 Glu His Ala Phe Phe Arg Arg Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Asn Arg
 595 600 605

Glu	Ile	Gln	Pro	Pro	Phe	Lys	Pro	Lys	Val	Cys	Gly	Lys	Gly	Ala	Glu
610						615					620				
Asn	Phe	Asp	Lys	Phe	Phe	Thr	Arg	Gly	Gln	Pro	Val	Leu	Thr	Pro	Pro
625					630					635					640
Asp	Gln	Leu	Val	Ile	Ala	Asn	Ile	Asp	Gln	Ser	Asp	Phe	Glu	Gly	Phe
				645					650					655	
Ser	Tyr	Val	Asn	Pro	Gln	Phe	Val	His	Pro	Ile	Leu	Gln	Ser	Ala	Val
			660					665					670		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATTCCGGAAG GGGCGAGGA AGGAAAC

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGAGCAAGAG GTGGTTGG

18

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTTCAGAGGG ACTGATGACT

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GCCTCTGCGG AATGGATCAC

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CTCCATCCAT CATGTGTTCC

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GACCTCATGT ACCACATTCA

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CTTCCACTAA GATAATGTTT

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GACCGACGAC TGTCTGTAGA

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: OUI

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CAGGGAGACT TCTGTCCTT

19

REVENDICATIONS

1. Polypeptide mutant de la protéine kinase C, caractérisé en ce qu'il présente la séquence d'acides aminés [SEQ ID N°2] et possède la mutation ponctuelle D 294 G par rapport à la PKC α ou en ce qu'il est
5 un variant dudit polypeptide résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou de plusieurs acides aminés, ledit variant présentant la même mutation ponctuelle que ledit polypeptide.

2. Séquence d'acides nucléiques codant pour le polypeptide selon
10 la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par :

- a) la séquence d'ADN [SEQ ID N°1] ;
- b) les séquences d'ADN hybridant avec la séquence ci-dessus ou un fragment de celle-ci ;
- c) les séquences d'ADN qui en raison de la dégénérescence du
15 code génétique résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour un polypeptide tel que défini ci-dessus,
- d) les séquences d'ARNm et d'ADNc correspondantes.

3. Sonde nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée
20 par un oligonucléotique qui s'hybride avec la séquence d'ADN selon la revendication 2, les séquences d'ADNc ou d'ARN correspondante.

4. Anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé contre le polypeptide selon la revendication 1.

25

5. Procédé de détection in vitro du polypeptide selon la revendication 1, à des fins de diagnostic des tumeurs, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter la séquence d'ADN codant pour ledit polypeptide par les étapes

30 a) d'amplification préalable des séquences d'ADN contenues dans un échantillon biologique susceptible de contenir ledit polypeptide, au moyen d'amorces,

b) mise en contact de l'échantillon biologique avec une sonde nucléotidique selon la revendication 3 ;

35 c) détection du complexe d'hybridation qui s'est éventuellement formé.

6. Procédé de détection in vitro du polypeptide selon la revendication 1, à des fins de diagnostic des tumeurs, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter, dans un échantillon biologique susceptible de
5 contenir ledit polypeptide, une séquence d'ARN codant pour ledit polypeptide par hybridation in situ à l'aide d'une sonde nucléotidique selon la revendication 3.

7. Procédé de détection in vitro du polypeptide selon la
10 revendication 1, à des fins de diagnostic des tumeurs, caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact un échantillon biologique susceptible de contenir ledit polypeptide avec un anticorps selon la revendication 4 et à détecter le complexe immunochimique formé.

15 8. Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN selon la revendication 2.

9. Vecteur recombinant selon la revendication 8, contenant en
20 outre les moyens nécessaires à son expression.

10. Microorganismes ou cellules hôtes transformés ou transfectés par un vecteur recombinant d'ADN selon la revendication 9.

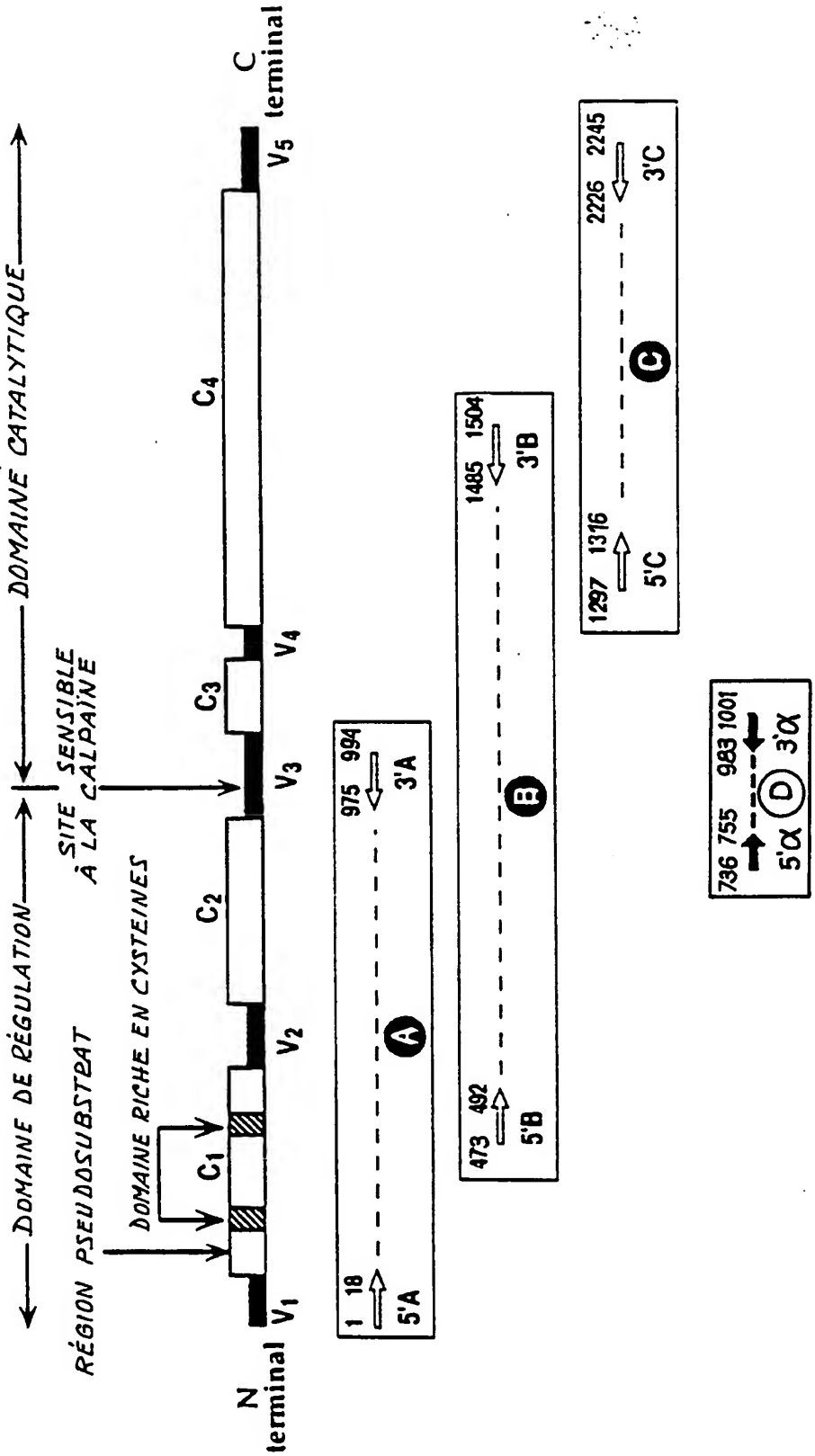
11. Cellules hôtes selon la revendication 10, caractérisées en ce
25 que lesdites cellules sont des cellules GC ou des cellules hypophysaires hyperplasiées.

12. Application de la sonde nucléotidique selon la revendication 3 à titre d'oligonucléotide antisens pour l'inhibition de la transcription
30 ou de la traduction de l'ARNm de la PKC α portant la mutation D 294 G soit in vitro, soit in vivo.

13. Application selon la revendication 12, caractérisée en ce que
35 l'oligonucléotide antisens est utilisé en combinaison avec une toxine ou tout autre élément permettant de détruire la cellule.

14. Médicament caractérisé en ce qu'il contient une sonde nucléotidique selon la revendication 3, éventuellement en combinaison avec une toxine ou un autre agent anti-tumoral.

FIG.1



2/3

FIG. 2

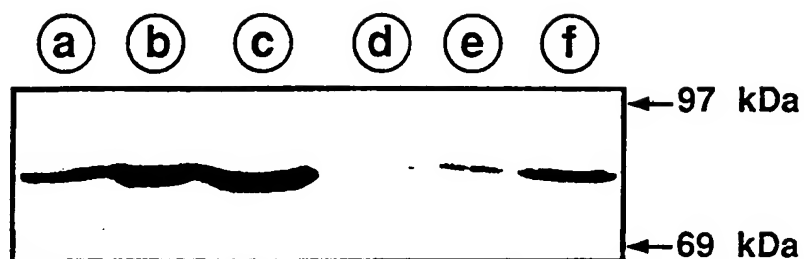
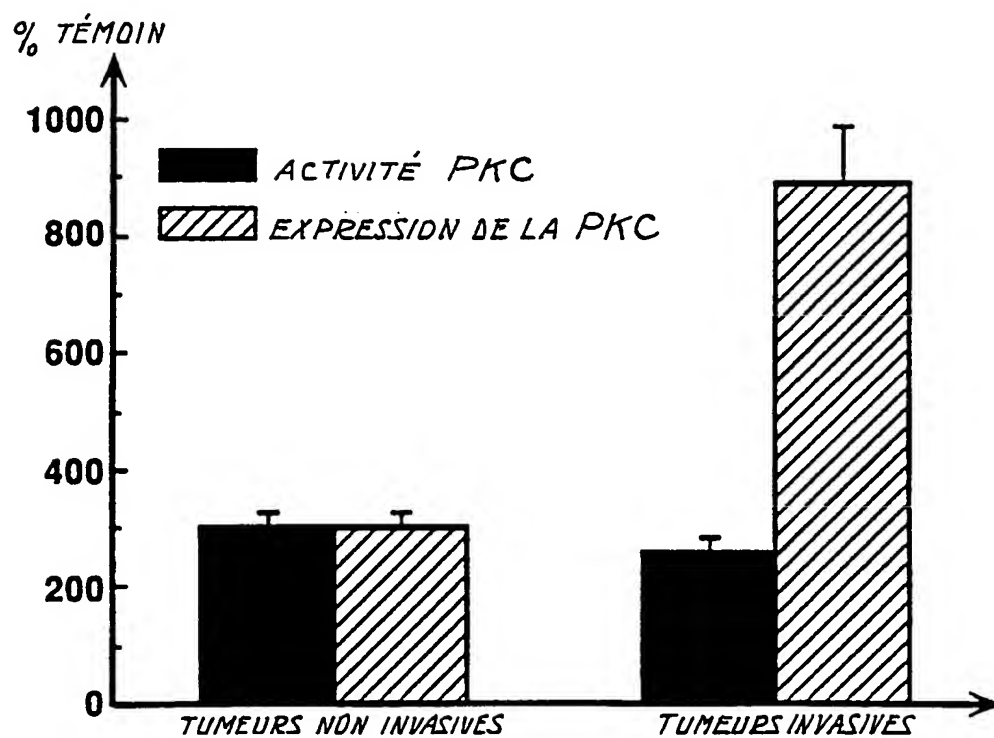


FIG. 3



3/3

FIG. 4

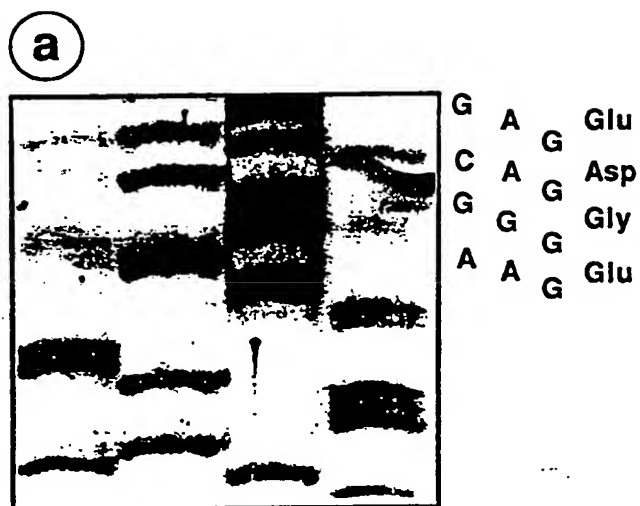


FIG. 5



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/68 C12Q1/48 G01N33/53
C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol.50, no.5, 12 March 1992 pages 724 - 730 ALVARO, V. ET AL. 'Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,4,7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 1994

Date of mailing of the international search report

18. 10. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCIENCE, vol.233, 22 August 1986, LANCASTER, PA US pages 859 - 866 COUSSENS, L. ET AL. 'Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathway' see page 861, right column, line 10 - line 16 see figure 2 ---	1-3,5,6
P,X	THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol.77, no.5, November 1993 pages 1125 - 1129 ALVARO, V. ET AL. 'Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C' see the whole document -----	1

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 5 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/68 C12Q1/48 G01N33/53
C12N15/11

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12N C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol.50, no.5, 12 Mars 1992 pages 724 - 730 ALVARO, V. ET AL. 'Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,4,7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
 "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
 "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
 "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
 "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 Septembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18. 10.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SCIENCE, vol.233, 22 Août 1986, LANCASTER, PA US pages 859 - 866 COUSSENS, L. ET AL. 'Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathway' voir page 861, colonne de droite, ligne 10 - ligne 16 voir figure 2	1-3,5,6
P,X	--- THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, vol.77, no.5, Novembre 1993 pages 1125 - 1129 ALVARO, V. ET AL. 'Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C' voir le document en entier -----	1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.